

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 636—639, November 1969

Eine schnelle Methode zur Bestimmung des gesamten und proteingebundenen Jods (PBI)

Von D. JÜNGST und L. STRAUCH

Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München

(Eingegangen am 31. Juli 1969)

Bei der beschriebenen Methode werden 0,1 ml einer Serumprobe, die zur Bestimmung von PBI mit Dowex 1 X 8 vorbehandelt wurde, in Reagenzgläsern mit einem HClO_3 -Reagenz bei 120° — 160° aufgeschlossen. Der Aufschluß dauert 30 Min. und wird mit einem temperaturregulierten Thermoblock vorgenommen. Die Jodbestimmung erfolgt durch katalytische Reduktion von Ce(IV) -Ionen. Die Reaktion wird durch Zugabe von Brucinsulfat abgestoppt und die Farbintensität des dabei gebildeten Brucin-Cer-Komplexes gemessen. Die Fehlergrenze beträgt unter 3%. Eine geübte Arbeitskraft kann mit einem Thermoblock täglich etwa 80—100 Serumproben analysieren.

A rapid method for the determination of total and protein-bound iodine (PBI)

In the present method, a 0.1 ml serum sample, pretreated with Dowex 1 X 8 for the determination of PBI, is digested in a test tube with a HClO_3 reagent at 120° — 160° . The digestion lasts 30 min. and is performed in a temperature-regulated thermoblock. The iodine is determined by the catalytic reduction of Ce(IV) -ions. The reaction is stopped by the addition of brucine sulphate and the colour intensity of the resulting brucine-Cer complex is measured. The error is less than 3%. With the aid of a thermoblock and with previous experience, 80—100 samples per day may be analysed.

Die Grundlagen der Schilddrüsendiagnostik beruhen auf den engen Beziehungen, die zwischen Jodstoffwechsel und Schilddrüsenaktivität bestehen. Das protein-gebundene Jod (PBI) im Serum besteht zum größten Teil aus dem in L-Thyroxin enthaltenen Jod. Die Menge des PBI gibt uns daher einen direkten Einblick in die Funktion der Schilddrüse.

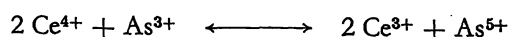
Die Jodkonzentration eines normalen Humanserums liegt im Bereich von $3,2$ — $7,2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$. Sie entzieht sich aus diesem Grund einem direkten chemischen Nachweis und ist nur mit Hilfe einer katalytischen Reaktion zu erfassen.

Die Bestimmung von PBI umfaßt im wesentlichen drei Schritte:

Trennung des PBI von anorganischem Jod, die durch Ausfällung von Serumproteinen (1, 2) oder durch Ausschütteln des Serums mit Ionenaustauschern erreicht werden kann (3, 4, 5).

Eiweißaufschluß und *Isolierung* des gebundenen Jods in der für die Bestimmung notwendigen Form. Von den trockenen Veraschungsmethoden (6) ist man in der letzten Zeit auf nasse Veraschungen übergegangen, von denen alkalische Aufschlüsse (7), saure Verfahren mit HClO_3 (2, 4, 8) oder mit HClO_4 und HNO_3 (3, 5, 9) mit gutem Erfolg angewendet werden.

Kolorimetrische Bestimmung mit Hilfe einer katalytischen Reaktion. In neuerer Zeit hat sich zur Bestimmung kleinerer Jodmengen ausschließlich das erstmalig von SANDELL und KOLTHOFF (10) verwendete Prinzip der katalytischen Beschleunigung der Reaktion



durch Jod durchgesetzt.

Die hier beschriebene Methode ist durch ihre Einfachheit und den geringen apparativen Aufwand jedem Krankenhauslaboratorium zugänglich und kann mit Erfolg für Routineuntersuchungen eingesetzt werden. Das anorganische Jod wird an Ionenaustauscher gebunden und so von PBI abgetrennt. Der Aufschluß der organischen Substanz und die Oxydation des Jods zum Jodat wird mit HClO_3 und Natriumchromat durchgeführt, da mit diesem Verfahren auch kleinste Jodmengen im Bereich von 1 ng mit Sicherheit erfaßt werden können. Im Gegensatz zu anderen Methoden, die zur Erhitzung des Aufschlußgemisches Kochplatten (2), Ölbäder (11) oder Sandbäder (12) verwenden, wird der Aufschluß hier in einem temperaturregulierbaren Thermoblock vorgenommen. Die kolorimetrische Jodbestimmung erfolgt nach der oben angegebenen Reaktion, wobei die durch Jod katalysierte Reduktion des gelben Ce^{4+} zu farblosem Ce^{3+} durch Zugabe von Brucinsulfat unterbrochen wird (4, 13—16).

Methodik

Reagenzien

Es werden Chemikalien des Reinheitsgrades pro analysi sowie deionisiertes Wasser mit einer Leitfähigkeit unter $0,1 \mu\text{S}$ verwendet.

Ionenaustauscher: Dowex 1 X 8, 20—50 mesh, Cl^- -Form.

HClO_3 -Reagenz nach ZAK (2):

50 g KClO_3 werden in 100 ml Wasser aufgelöst und erhitzt. Zur siedenden klaren Lösung werden langsam 37 ml HClO_4 (70proz. Dichte 1,67) gegeben. Anschließend wird die Lösung etwa 8 Stdn. bei $+4^\circ$ aufbewahrt, wodurch der gebildete KClO_4 -Niederschlag vollständig auskristallisiert. Nach Abfiltrieren wird das Aufschlußreagenz, etwa 30proz. HClO_3 , bei $+4^\circ$ in einer dunklen Flasche aufbewahrt.

Natriumchromatlösung 0,6proz. (g/v) in Wasser: 0,6 g Na_2CrO_4 werden in 100 ml Wasser aufgelöst.

Konz. H_2SO_4 (Dichte 1,84).

Arsenige Säure (0,2N in 1N H_2SO_4):

1,96 g As_2O_3 und 1,4 g NaOH-Plättchen werden in 80 ml Wasser aufgelöst. Mit Phenolphthalein wird mit konz. Schwefelsäure bis zum Umschlagspunkt titriert. Nach Zugabe von 5,6 ml konz. H_2SO_4 wird auf 200 ml aufgefüllt. Anschließend werden 5,0 g NaCl dazugegeben und aufgelöst.

Cerammoniumsulfat (0,025N in 2N H_2SO_4):

1,57 g Cerammoniumsulfat und 5,2 ml konz. H_2SO_4 werden in 100 ml Wasser aufgelöst.

Brucinsulfat 1,0proz. (g/v):

1,0 g Brucinsulfat werden in 100 ml Wasser aufgelöst.

Jodstandardlösungen:

168,5 mg KJO_3 werden in 1 ml Wasser aufgelöst (100 μg Jod/ml). Von dieser Stammlösung wird durch mehrmaliges Verdünnen eine 16 μg Jod/100 ml-Lösung hergestellt.

Apparaturen

Glasgeräte

Für die Bestimmung werden Reagenzgläser 16×160 mm Duran 50, Schott u. Gen., Mainz, verwendet. Weiterhin werden Meßpipetten von 0,1–1,0 ml sowie Vollpipetten von 1,0 und 2,0 ml benötigt. Auf eine gründliche Reinigung aller bei der PBI-Bestimmung benutzten Glasgeräte muß besonderer Wert gelegt werden.

Aufschlußgerät

Der Aufschluß erfolgt im WTW-Thermoblock (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, 812 Weilheim/Obb., Trifhofstr., zu beziehen unter der Bezeichnung Thermoblock TB 4), einem elektrisch beheizten Aluminiumblock, der mit einem stufenlos einstellbaren Temperaturregler ausgestattet ist. Zur besseren Erwärmung der aus dem Gerät ragenden Reagenzgläser wird auf den Block ein außen isolierter Blechring aufgesetzt.

Photometer

Die optischen Messungen wurden in der vorliegenden Arbeit mit einem Beckman DU Spektrophotometer ausgeführt.

Ausführung der Bestimmung

Abtrennung des anorganischen Jods

1,5–2,0 ml Serum werden in einem trockenen Reagenzglas mit 300 mg Ionenaustauscher versetzt und etwa 5 Min. ausgeschüttelt.

Aufschluß der organischen Substanz

Nach Absetzen des Ionenaustauschers werden vom Überstand 0,1 ml Serum entnommen und in ein Reagenzglas gegeben. Für diesen Arbeitsgang empfiehlt sich die Anwendung einer automatischen Eppendorfpipette mit auswechselbarer Kunststoffspitze. Nach Zugabe von 1,0 ml HClO_3 -Reagenz und 0,05 ml 0,6proz. Na_2CrO_4 -Lösung werden die Reagenzgläser in die Bohrungen des auf 120° vorgewärmten Thermoblocks mit dem aufgesetzten Wärmedämmring eingesetzt. Ein Schütteln der Reagenzgläser ist unbedingt zu vermeiden, damit der Proteinniederschlag nicht zu hoch an der Glaswand haften bleibt und so der Einwirkung des heißen Aufschlußgemisches entzogen wird. Analog zur unbekannten Serumprobe wird von der 16 μg /100 ml Jodstandardlösung eine Verdünnungsreihe mit 0 ml; 0,025 ml; 0,05 ml; 0,075 ml; 0,1 ml entsprechend 0; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0 μg /Jod/100 ml ange-setzt. Nach Ablauf der ersten 10 Min. wird die Aufschlußtemperatur von 120° auf 160° erhöht. Die gebildete HClO_4 steigt in Form eines Siederinges, der aus kleinen, das Glas nicht benetzenden Tröpfchen besteht, die Glaswand hoch. Innerhalb von etwa 5 Min. ist die Endtemperatur von 160° erreicht, bei der der Aufschluß noch weitere 15 Min. geführt wird. Die gesamte Aufschlußdauer beträgt also etwa 30 Min. Am Ende des Aufschlusses verbleibt ein bernsteinfarbener Rückstand von etwa 0,1 ml Volumen. Die Reagenzgläser werden aus dem Thermoblock entfernt und auf Zimmertemperatur abgekühlt, wobei rote CrO_3 -Kristalle ausfallen.

Die kolorimetrische Bestimmung

Zu dem in den Reagenzgläsern verbliebenen Rückstand werden 0,2 ml konz. H_2SO_4 sowie 2,0 ml arsenige Säure gegeben. Um eine vollständige Reduktion des Jodats in Jodid zu erreichen, werden die Proben 20 Min. im Wasserbad bei 37° inkubiert (15). In genauen Zeitabständen (20–30 Sek.) wird 1,0 ml Cerammoniumsulfatlösung hinzugefügt und sofort gut umgeschüttelt. Nach einer bestimmten Zeit, die für alle Proben genau gleich sein muß (in der Praxis zwischen 20 bis 30 Min.), wird die Farbreaktion durch Zugabe von 0,2 ml Brucinsulfatlösung unterbrochen. Um eine Stabilisierung des Brucin-Cer-Komplexes zu erreichen, werden die Proben etwa 30 Min. bei 37° inkubiert (15, 16). Die Messung der Farbtintensität erfolgt bei 428 nm.

Aus den Meßergebnissen der Jodstandardreihe wird auf semilogarithmischem Millimeterpapier ein Meßdiagramm konstruiert und aus diesem der Gehalt der unbekannten PBI-Mengen ermittelt.

Ergebnisse

Um die Vollständigkeit des Aufschlusses zu überprüfen, wurden exakt eingewogene organische jodhaltige Testsubstanzen untersucht.

Tab. 1
Bestimmung des Jodgehaltes in Testsubstanzen

Probe	Jod vorgegeben (μg)	Jod gefunden (μg)	(%)
Jodacetamid gelöst in H_2O	0,108	0,111	102,8
		0,120	111,1
		0,116	107,4
		0,119	110,4
Jodessigsäure	0,147	0,132	89,8
		0,143	97,3
		0,150	102,0
		0,153	104,1
Dijodtyrosin gelöst in verd. H_2SO_4	0,054	0,060	111,1
		0,056	103,7
L-Thyroxin gelöst in verd. NaOH	0,034	0,033	97,1
		0,035	102,9

Um Jodverluste während des Aufschlusses auszuschließen wurden Seren mit bekanntem Jodgehalt mit zugefügten KJO_3 -Standards und mit Testsubstanzen untersucht.

Tab. 2
Bestimmung des Jodgehaltes im Serum unter Zugabe von Testsubstanzen

Serum-Jod ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	Jod hinzugefügt ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	als	berechnet ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	Jod gefunden ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)
3,0	4,0	KJO_3	7,0	6,8
				6,6
				7,1
				7,3
5,0	4,0	KJO_3	9,0	8,2
				8,5
				8,8
				9,3
5,0	8,0	KJO_3	13,0	12,3
				12,8
				13,2
				13,4
3,0	3,3	Thyroxin	6,3	6,0
				6,4
3,0	5,4	Dijodtyrosin	8,4	8,5
				9,0
3,0	10,8	Jodacetamid	13,8	13,5
				13,5
3,0	14,7	Jodessigsäure	17,7	17,0
				17,7

Zur Festlegung der Fehlergrenze wurde ein Humanserum in mehreren Analysen untersucht.

Tab. 3
Bestimmung des Jodgehaltes in einem humanen Standardserum

Probe lfd. Nr.	Jod gefunden ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	% des arith- metrischen Mittels
1.	5,5	94,4
2.	5,7	97,9
3.	6,0	103,0
4.	5,7	97,9
5.	5,9	101,3
6.	5,9	101,3
7.	5,8	99,5
8.	5,8	99,5
9.	5,6	96,1
10.	6,1	104,7
11.	6,0	103,0
12.	5,6	96,1
13.	5,9	101,3
14.	5,8	99,5
15.	6,0	103,0
16.	6,1	104,7
17.	5,8	99,5
18.	5,9	101,3
19.	5,6	96,1
20.	5,8	99,5
\bar{x}	$5,825 \pm 0,17$	$100,0 \pm 3,0$

Die an Hand der Tabelle 3 ausgerechnete Standardabweichung beträgt $\pm 0,17$ oder weniger als 3% des Mittelwertes.

Eine typische Eichgerade zur Bestimmung der unbekannten Jodkonzentration ist in Abbildung 1 angegeben.

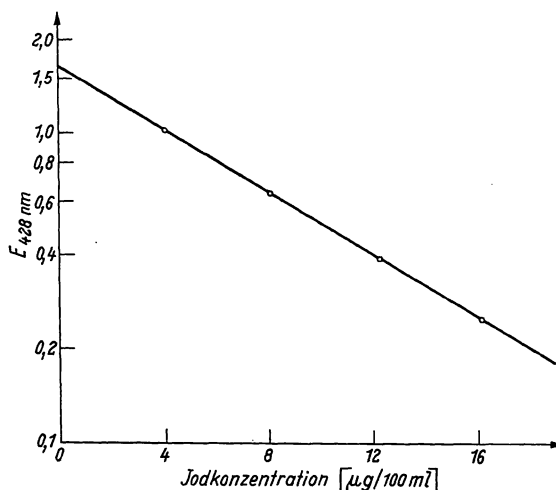


Abb. 1

Semilogarithmische Auftragung der Jodkonzentration in Abhängigkeit von der Farbintensität des Brucin-Cer-Komplexes

Diskussion

Die beschriebene Methode stellt eine Verbesserung der von ZAK (2) entwickelten Jodbestimmung dar. Das anorganische Jod im Serum wird mit Ionenaustauschern abgetrennt, wodurch die Bestimmung erheblich verkürzt und vereinfacht wird. Mit radioaktiven Jodisotopen konnte nachgewiesen werden, daß über 90% des anorganischen Jods an den Ionenaustauscher adsorbiert werden (3). Der anorganische Anteil am Gesamtjod im Serum beträgt etwa 10%, so daß er nach der Behandlung mit dem Ionenaustauscher auf etwa 1% zurückgeht.

Der Aufschluß der organischen Substanz wird bei Temperaturen von 120–160° durchgeführt. Die während

des Aufschlusses notwendige Temperaturregelung ist bei Verwendung des Thermoblocks einfach zu verwirklichen. Die Veraschungsdauer hängt im wesentlichen von der Menge des verwendeten HClO_3 -Reagenzes ab. Um ein ausreichendes Sauerstoffangebot zu gewährleisten, sollte das Verhältnis HClO_3 : Serum etwa 10 : 1 betragen. In der angegebenen Methode werden 0,1 ml Serum mit 1,0 ml HClO_3 -Reagenz aufgeschlossen, wodurch die Serumproben schon nach 30 Min. ausgewertet werden können. Die Anwesenheit von Na_2CrO_4 hat auf das Oxydationspotential keinen Einfluß. Die Substanz dient als Redox-Indikator, da die Chromionen bei verschiedenen Oxydationsstufen verschiedene Farben annehmen (17). Gelb gefärbte CrO_3 -Ionen zeigen an, daß das vorhandene Jod mit Sicherheit in der nichtflüchtigen HJO_3 -Form vorliegt. Schlägt die Farbe in irgendeiner Phase des Aufschlusses in grün, als Anzeichen von Cr_2O_3 -Ionen um, sind Jodverluste durch Bildung von gasförmigen HJ möglich.

Das Auftreten von grünen Chromionen beobachtet man am häufigsten in der zweiten Hälfte des Aufschlusses, wenn nur noch geringe Mengen HClO_3 vorhanden sind. Durch Zugabe von einem Tropfen Aufschlußreagenz 10 Min. vor Ende des Aufschlusses kann diese Erscheinung verhindert werden. Die gleichmäßige Erwärmung der Reagenzgläser durch den Wärmedämmring ermöglicht eine schnelle Aufschlußführung, da die Bildung von Kondenswasser an der Glaswand verhindert wird. Außerdem wird dadurch die Kondensation von niederen Fettsäuren oder anderer unvollständiger Oxydationsprodukte des Serums an der Glaswand verhindert (8). Schon Spuren dieser Substanzen interferieren mit der anschließenden kolorimetrischen Bestimmung, da sie die Entfärbung des Cerions durch direkte Reduktion beschleunigen.

Am Ende des Aufschlusses muß auf annähernde Volumengleichheit der verbliebenen HClO_4 -Chromat-Rückstände geachtet werden, damit bei der kolorimetrischen Bestimmung gleiche HClO_4 -Konzentrationen vorliegen.

Die Vollständigkeit des Aufschlusses muß nach drei Gesichtspunkten beurteilt werden:

a) Als Zeichen für die vollständige Umwandlung der HClO_3 in HClO_4 gilt das Auftreten von HClO_4 -Tröpfchen, die die Glaswand nicht benetzen. Dieser Punkt muß unbedingt erfüllt sein, da zurückgebliebene HClO_3 durch Reoxydierung des gebildeten Ce^{3+} -Ions mit der kolorimetrischen Bestimmung interferiert. Außerdem bildet sie mit Brucin einen gelben Farbstoff, der ein Abstoppen der Reaktion unmöglich machen würde (16).

b) Nach Abkühlung des Aufschlußgemisches auf Raumtemperatur müssen rote CrO_3 -Kristalle ausfallen.

c) Nach Absetzen der Kristalle muß ein klarer und farbloser Überstand entstehen.

Diese Bedingungen sind bei Einhaltung der vorgeschriebenen Arbeitsweise in den meisten Fällen gegeben.

Die kolorimetrische Bestimmung wird im gleichen Reagenzglas durchgeführt, so daß Verunreinigungen und Substanzverluste vermieden werden. Wegen der geringen aufgeschlossenen Serummengen liegen die zu bestimmenden Jodmengen im Bereich von 0–16 ng. Es ist bezeichnend für die Empfindlichkeit der Farb-reaktion, daß sich solche Mengen noch exakt bestimmen lassen. Der katalytische Effekt des Jodidions kommt besonders gut zur Geltung, wenn die im Reaktionsgemisch vorliegenden H_2SO_4 - und HClO_4 -Konzentrationen in einem günstigen Verhältnis stehen. Während eine Erhöhung der H_2SO_4 -Konzentration die Entfärbung des Ce^{4+} -Ions verlangsamt und damit die Empfindlichkeit der kolorimetrischen Bestimmung erhöht, macht sich bei einer Erhöhung der HClO_4 -Konzentration der umgekehrte Effekt bemerkbar. Die exaktesten und steilsten Standardgeraden erzielt man bei einer $4\text{--}8\text{ N H}_2\text{SO}_4$ -Konzentration und möglichst geringem HClO_4 -Gehalt. Diese Bedingungen sind in der beschriebenen Methode erfüllt (18).

Die Unterbrechung der Farbreaktion ermöglicht eine exakte Auswertung, da sich die Intensität des stabilisierten Brucin-Cer-Komplexes innerhalb von 24 Std. nicht ändert (16).

Die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse zeigen eine gute Reproduzierbarkeit der Standardgeraden. Die gegebenen jodhaltigen Testsubstanzen wurden vollständig wiedergefunden. Bei der Bestimmung von Jodstandards und von Testsubstanzen im Serum konnten keine Jodverluste beobachtet werden. Die aus einer Mehrfachbestimmung des Humanserumpools ermittelte Standardabweichung liegt noch unter $\pm 3\%$ des Mittelwertes.

Eine eingetübte Arbeitskraft kann in einem Arbeitsgang, der etwa 2 Std. dauert, mit einem Aufschlußgerät 10 Serumproben in Parallelbestimmung analysieren. Die beschriebene Methode eignet sich sehr gut zur Routinebestimmung von PBI sowie von Gesamtjod und kann, wegen des geringen apparativen Aufwandes, auch in kleineren Laboratorien ausgeführt werden.

Literatur

1. SOMOGYI, M., J. biol. Chemistry 86, 655 (1930). — 2. ZAK, B., H. H. WILLARD, G. B. MYERS und A. J. BOYLE, Analytic. Chem. 24, 1345 (1952). — 3. KUTZIM, H., Technicon Symposium 1965, Frankfurt, S. 855. — 4. FARRELL, L. P. und M. H. RICHMOND, Clin. chimica Acta Amsterdam 6, 620 (1961). — 5. Technicon Instruction Manual, NO. PB/D — 1. — 6. MICHEL, O. und G. DELTOUR, Bull. Soc. Chim. biol. 31, 1125 (1949). — 7. BARKER, S. B., J. biol. Chemistry 173, 715 (1948). — 8. HOCH, H., S. L. SINNETT und T. H. MCGAVACK, Clin. Chem. New York 10, No. 9 (1964). — 9. GOCHMAN, N., Technicon Symposium 1964, Frankfurt, S. 429. — 10. SANDELL, E. B. und J. M. KOLTHOFF, Mikrochim. Acta 1, 9 (1937). — 11. MANTZOS, J. D. und B. MALAMOS, Clin. chimica Acta Amsterdam 21, 501 (1968). — 12. BODANSKY, O., R. S. BENUA und G. PENNACCHIA, Amer. J. Clin. Path. 30, 375 (1958). — 13. FISCHL, J., Clin. chimica Acta Amsterdam 1, 462 (1956). — 14. GROSSMANN, A. und G. F. GROSSMANN, J. Clin. Endocr. Springfield 15, 354 (1955). — 15. LEPP, A., H. PENA, V. HOXIE und L. OLINER, Amer. J. Clin. Path. 44, 331 (1965). — 16. HASCHEN, R. J. und N. REHFELD, Dtsch. Gesd.wes. 37, 1590 (1963). — 17. STRICKLAND, R. D., und C. M. MALONEY, Analytic Chem. 29, 1870 (1957). — 18. JÜNGST, D., Dissertation, Universität München, 1969.

Dr. L. Strauch
8000 München 15
Schillerstr. 46